

# ショウジョウバエ近縁種における味覚受容体遺伝子の機能的変異と進化に関する研究

著者	篠崎 賢次
号	14
学位授与番号	441
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/42626">http://hdl.handle.net/10097/42626</a>

氏名（本籍地）	篠崎 賢次 <sup>しのざき けんじ</sup>
学位の種類	博士（情報科学）
学位記番号	情博第441号
学位授与年月日	平成21年 3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科、専攻	東北大学大学院情報科学研究科（博士課程）システム情報科学専攻
学位論文題目	ショウジョウバエ近縁種における味覚受容体遺伝子の機能的変異と進化に関する研究
論文審査委員	（主査）東北大学准教授 磯野 邦夫 東北大学教授 井樋 慶一 東北大学教授 飛田 渉

## 論文内容の要旨

### 第1章 序論 および 第2章 背景

感覚受容体は、生物にとって有用な、あるいは有害な外部情報を神経情報に変換する感覚ニューロンの機能を実現する上で本質的に重要な分子である。外界に存在する化学物質の種類はきわめて多いが、それらに対応するために動物の化学感覚ニューロンに備わった嗅覚受容体や味覚受容体も遺伝的に多様化して多種類のものがあることがわかっている。1991年にAxelとBuckによりマウスとヒトで嗅覚受容体遺伝子が発見されたことが契機となり、これまでに哺乳類や昆虫で多数の嗅覚受容体、味覚受容体、フェロモン受容体などが同定されている(Axel and Buck, 1991)。昆虫でも2000年にキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* で味覚と嗅覚でそれぞれ計約60個の受容体候補遺伝子が発見された(Clyne et al., 2000)。われわれの研究室ではこのハエを用いて2001年に甘味物質である二糖類のトレハロースの受容体遺伝子Gr5aを同定した(Ueno et al., 2001)。これは無脊椎動物で最初に同定された味覚受容体である。ショウジョウバエでは苦味受容体や二酸化炭素受容体遺伝子など、これまで同定されている味覚受容体のすべてはGr5aと同じ味覚受容体遺伝子ファミリーGRに属する受容体であり、このハエの嗅覚受容体ファミリーであるORと弱い類縁性はあるが別であることがわかっている。動物の化学感覚受容体はどれも、7回膜貫通型受容体と総称されるGタンパク質共役受容体のスーパーファミリーに属するタンパク質である点で共通しているが、哺乳動物とショウジョウバエの味覚受容体を比較すると、そのアミノ酸残基配列に共通性はまったくなく、化学感覚は系統的に隔たった生物ごとに進化していることが明らかになっている。

外部環境に存在する様々な化学物質を認識する受容体として味覚受容体はどのようにして多様化し進化したのであろうか。この問題に対してはまだ答えは得られていないが、これは種の進化と密接に関連していると思われる。同じ種であっても、集団中に味覚受容体としての機能的な変異があることがいくつかの動物で知られている。ヒトには古くから苦味物質フェニルチオウレア（PTC）に対する味覚感度に個人差があり、メンデル遺伝することが知られていたが、現在ではこれがhT2R38と呼ばれる苦味受容体のアミノ酸残基変異によることがわかっている(Kim et al., 2003)。マウスでも、人工甘味物質のサッカリンに対する味覚感度の系統差が甘味受容体遺伝子であるmT2R3の変異として同定された(kuhn et al., 2004)。ショウジョウバエでもわれわれの研究室は自然集団中に存在するGr5aのアミノ酸残基配列の置換変異を発見している(Ueno et al., 2001)。

注目すべき点の1つはこれらの変異のどれもが単なるアミノ酸置換ではなく、変異により受容体としての機能を失わせる機能的な変異である点である。そこで同種内や、近縁種内で起こる機能的変異

は、味覚受容体の進化を探る上で重要な手がかりを提供する可能性があると思われる。しかしこれまでに種内と近縁種間を比較する味覚受容体遺伝子の比較進化を体系的に調べた研究はまだ行われていない。そこで本研究では味覚受容体の研究だけでなく、ショウジョウバエ属に属する多くの種について系統発生上の関係がわかっているショウジョウバエに注目し、味覚受容体遺伝子の機能的変異をキイロショウジョウバエの近縁種であるオナジショウジョウバエを用いて調べ、キイロショウジョウバエと比較することにした。

### 第3章 研究の材料と方法

遺伝子解析と味覚の行動解析実験にはキイロショウジョウバエ (*Drosophila, melanogaster*) の近縁種であるオナジショウジョウバエ (*Drosophila, simulans*) の5種類の野生型系統と実験室で作成された2種類の突然変異系統をもちいた。

#### 1、二糖溶液選択摂食実験

数十匹から百数十匹の羽化後1週間以内の元気なハエを摂食実験前日にバイアルに集め、底に敷いたキムワイプに100mM ショ糖溶液を1.5ml 染み込ませたものを摂氏25度で2時間与えた。その後、蒸留水のみを染み込ませたキムワイプを敷いた別のバイアルにハエを移し、摂氏25度で20時間絶食させたハエを味覚実験に用いた。味覚応答はTanimuraらの方法を改変した以下の摂食行動実験により解析した(Tanimura et al., 1982)。赤色、青色の二種類の食用色素を混ぜた糖溶液を選択させた。糖溶液には20mM のトレハロース溶液を用いて1%寒天と青色食用色素0.125mg/ml brilliant blue FCF (和光純薬製品) を混ぜた溶液とコントロールとして2mM スクロース溶液と赤色食用色素0.5mg/ml acid red 52 (和光純薬製品) を混ぜた溶液を蓋付きミニトレイ (5.5cm×8cm 60穴 Nunc 社) のウェルに分注したものを用意した。絶食後のハエを吸虫管でミニトレイの中に移し、遮光箱の中に入れ摂氏25度で一時間摂食させた。摂食後はミニトレイにハエを入れたまま摂氏-20度で凍結させた後、各個体がどちらの溶液を好んで摂食したかを実体顕微鏡でハエの腹部の着色を観察して調べ、青色、赤色、紫色、無色の四つのグループに分けてそれぞれの個体数を数えた。着色した個体数の中で青色個体の数と紫色個体の半数を足し、これを着色個体の総数で割って、トレハロース溶液に対する嗜好性 (Preference Index, PI) とした。
$$\text{Preference Index} = (\text{Blue} + \text{Purple} / 2) / (\text{Blue} + \text{Purple} + \text{Red})$$

#### 2、単独糖の二濃度選択摂食実験

スクロース溶液における濃度弁別能を解析するために、二糖選択摂食実験のときに用いた20mM トレハロース溶液と2mM スクロース溶液の代わりに異なる濃度のスクロース溶液を選択させ、濃度差をどの程度弁別できるかを解析する濃度弁別実験を行った。コントロールには常に0.5mM スクロースを用い、これに対する2mM スクロース溶液に対する選択率をPIとして求めた。選択に用いる2つのスクロース液の濃度が近いと赤、青二色素間に、弱い嗜好性のバイアスが存在することが確認されたので、色素と糖溶液は二種類の組み合わせを同時に行い、その平均値をPIとした。

#### 3、遺伝子解析

ショウジョウバエ10匹からQIAGENのDNeasy Tissue Kitを用いてゲノムDNA抽出を行なった。次に精製したDNAを鋳型にしてPCR法により甘味受容体遺伝子を複製増幅した。ライゲーションおよび形質転換を行い、遺伝子増幅を行なった。プラスミドDNAの精製を行いピックダイデオキシ法を用いて塩基配列解析を行なった。

## 第4章 結果 および 第5章 考察

ショウジョウバエ属は 17 亜属に分類され、キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエの属する亜属はシマショウジョウバエ亜属 *Sophophora* Sturtevant と呼ばれる亜属である。この亜属はさらに種群と呼ばれる小グループに分類され、両種はどちらもキイロショウジョウバエ種群 (*D. melanogaster* sp. group) に入る両者間で種間交雑も可能なほど近縁の 2 種である。しかしこの 2 種は生態学的に異なっており、オナジショウジョウバエが野性環境に近いところを好むのに対し、キイロショウジョウバエは人家に近い場所を好むとされている。ショウジョウバエ属のハエはどれも発酵した果物などを好む傾向があるが、この 2 種は好む果実など食性でも違いがあると言われている。味覚受容体遺伝子は、食性を左右する大事な遺伝子のひとつと考えられるので、種の分化や進化にとり考慮すべき重要な遺伝子である。本研究はオナジショウジョウバエがキイロショウジョウバエの近縁 2 種の味覚と味覚を担う重要な機能タンパク質である味覚受容体について解析比較を行う最初の試みである。

まず両者の味覚機能を比較すると、近縁種であっても味覚応答性の種内変異について顕著な違いが存在することが初めて明らかにされた。甘味を担うキイロショウジョウバエの味覚受容体をコードする遺伝子として無脊椎動物において最初に発見された Gr5a 味覚受容体遺伝子についてはこれまで多くの研究者により研究がなされ、その分子機能とともに、生理学的、行動学的な解析など多くの研究がなされている。キイロショウジョウバエでは集団内に *Tre* と呼ばれていた自然突然変異が古くから知られており、これが Gr5a の発見と味覚受容体としての同定に重要な役割となりとなった (Ueno et al., 2001)。Gr5a は二糖類トレハロースに高い親和性をもつ甘味受容体であるが、キイロショウジョウバエの集団には Gr5a の翻訳領域に存在する一塩基置換で生ずるアミノ酸置換 (*Tre01* 変異) により受容体としての機能をほとんど失う変異アリルが集団中の約半分から 70% 程度の個体の中に分布し、自然突然変異としてはかなり高い頻度であることがわかっていった。

オナジショウジョウバエの Gr5a 遺伝子配列を調べた先行研究では、どの個体でも機能を失った *Tre01* アリルをもつ個体だけが見つかっている。機能を持たない受容体である *Tre01* が祖先型として両種の祖先に存在していたのか、あるいはどちらの変異も存在していて、進化の途上でオナジショウジョウバエは機能をもつ方のアリル (*Tre+*) が何らかの理由で集団中から失われたのかかわからないが、遺伝子として機能をもっているアリルの方が淘汰される例はそれほど多くないので、このような遺伝的变化は大きななぞである。

本研究では摂食行動を調べることによりオナジショウジョウバエにおいても *Tre01* 型がキイロショウジョウバエと同様に機能を持たない受容体であることをまず示した。次にオナジショウジョウバエでは、集団内に *Tre* 変異が存在しないにもかかわらず、甘味応答の個体差、系統差をもたらす遺伝的な変異がやはり存在することを示した。この変異を遺伝解析すると Gr5a ではなく第 3 染色体上にある別な遺伝子によることがわかった。そこで、7 個の第 3 染色体上の甘味受容体遺伝子である Gr61a、Gr64a~f について、ゲノム DNA の配列情報の解析を行い、それぞれをいろいろな系統間で比較した。

これら 7 個のすべてが甘味受容体遺伝子なのかどうか、また逆にこれら以外にも甘味受容体遺伝子が存在するのかどうかについてはまだ不明である。しかし Gr5a を含めて全部で 8 個の甘味受容体は 60 個ある味覚受容体遺伝子の約 12% に相当する上、これ以外にも多数の苦味受容体遺伝子やその他の味覚受容体が知られているので、これら 8 個で甘味受容体をほぼカバーすると考えてよいかも知れない。実際にこれらの中で Gr61a がフルクトースなどに特異性をもつ甘味受容体であること (古波津, 2006)、また Gr64 遺伝子グループのうち Gr64a と Gr64f についてはたしかに遺伝子そのもの、あるいはそれらの遺伝子を発現する味覚ニューロンを不活化すると甘味応答が部分的に失われること (Dahanukar et al., 2007 Jiao et al., 2007) などが報告されているので、これらすべてを甘味受容体、あるいはその候補と考えるのが妥当であると思われる。7 個の甘味受容体候補からオナジショウジョウバエの 118 系統には Gr61a と Gr64d の 2 つの遺伝子について重大な機能障害をもたらすと考え

られる翻訳領域の塩基欠失によるフレームシフト変異を発見したが、118 系統はスクロース濃度弁別感度が高い方のグループに属するので、これらの変異がスクロース濃度弁別に関わる変異ではなく、また Gr61a と Gr64d の 2 つもそれに関わる甘味遺伝子である可能性はないと考えられる。

Gr64 グループの他の 5 種類については、配列解析からはまだ完全にスクロース濃度弁別感度と対応するような配列上の変異が残念ながらこれまでには見つからなかった。機能変異としてはアミノ酸残基の置換変異の他にも、イントロン-エクソンのスプライス変異の可能性や、プロモーターやエンハンサーなど遺伝子上流部の発現制御部位の変異なども可能性として考えられる。したがってこれらの可能性を今後検討する必要がある。調べられたすべてのオナジショウジョウバエの系統で Gr5a 遺伝子はトレハロース味覚受容体としては機能しないことが示唆されただけでなく、Gr61a と Gr64d の 2 つの遺伝子について一部の系統では機能的に重大な障害が起こると考えられるフレームシフト変異が発見されたことは注目される。これらの変異が淘汰において適応的な変異であるとは考えられず、味覚受容体遺伝子の進化における意義について今後注目される。

## 第 6 章 結論

本研究ではオナジショウジョウバエの甘味応答と甘味受容体候補遺伝子についての解析を行い、以下のような結論を得た。キイロショウジョウバエの自然集団で報告されているトレハロース味覚感度を支配する受容体 Gr5a の機能変異 Ala218Thr はオナジショウジョウバエには存在せず、受容体としての機能をほとんど持たない Thr218 側に固定している。摂食実験により、オナジショウジョウバエの Gr5a はトレハロース受容体として機能していない可能性が示唆された。オナジショウジョウバエの甘味応答性を系統間で比較すると、第 3 染色体上にトレハロースではなく、スクロース味覚感度を支配する新しい味覚遺伝子の存在が証明された。オナジショウジョウバエの甘味受容体候補遺伝子を解析したところ、一部の系統に受容体の機能を失わせる可能性の高いフレームシフトと変異が Gr61a と Gr64d の 2 つの遺伝子に見つかった。しかし、スクロース濃度弁別感度を支配する遺伝子がこれらの候補遺伝子のどれに相当するのかについては、同定までに至らなかった。



## 論文審査結果の要旨

第1章は序論である。

第2章はこの研究の背景である。今世紀に入り米国を中心に急速に進展したショウジョウバエの味覚受容体に関する研究の流れと現時点における研究課題が述べられている。

第3章は研究材料と研究方法である。本論文ではキイロショウジョウバエと近縁のオナジショウジョウバエを初めて味覚受容体研究の実験材料としてとりあげ、種内、種間の比較を通して味覚受容体遺伝子と味覚受容体の機能を調べるため、新たに開発し、あるいは改良した実験的技術が述べられている。

第4章は結果である。無脊椎動物の味覚受容体として最初に同定された *Gr5a* はキイロショウジョウバエの二糖類トレハロースの甘味受容体遺伝子であるが、野生型の *Gr5a* には単一アミノ酸残基置換をもたらす機能変異(Ala218Thr)があり、甘味応答に個体差や系統差をもたらす。オナジショウジョウバエでも甘味応答性に顕著な系統差があり、これがトレハロースでなく蔗糖に対する味覚感度の系統差に起因することを明らかにした。一方 *Gr5a* の218番目のアミノ酸残基は受容体機能を持たない Thr 型であることを示した。本研究では複数の系統について、*Gr5a* およびこれと相同性を有する *Gr61a*, *Gr64a*, *Gr64b*, *Gr64c*, *Gr64d*, *Gr64e* および *Gr64f* の全8種類の遺伝子の翻訳領域の全塩基配列を解析して比較した。

第5章は考察である。オナジショウジョウバエの蔗糖に対する応答感度の系統差をもたらす因子は遺伝解析により第3染色体上に存在することが明確に示されており、この因子が7つの相同遺伝子のどれか1つか、それらの組み合わせで決定される受容体である可能性が高いことが示唆された。野生系統の1つでは相同遺伝子のうち *Gr61a* と *Gr64d* の2つに数塩基長にわたる欠失が見つかり、受容体遺伝子としてどちらも機能しないことがわかった。これらの結果は味覚受容体を解析する新しい手がかりとして重要な発見である。しかしながら、蔗糖に対する味覚感度と対応する変異は同定されなかった。

第6章は結論である。

以上要するに本論文は7種類の甘味受容体遺伝子のそれぞれについて、全翻訳領域を体系的に解析し、蔗糖応答感度の遺伝的差異をもたらす塩基配列上あるいはアミノ酸残基配列上の変異を解析した研究である。本論文の中では蔗糖感度と相関する変異の同定には至らなかったため、これらの遺伝子上流域や転写産物の配列解析が今後の課題である。しかしながら、本論文はきわめて近縁の2種の動物間においても味覚受容体遺伝子上に機能的な変化をもたらすゲノム DNA 配列上の変異が複数起きていることを示した点で、動物のゲノムの中で最も多様化し分化した遺伝子であると考えられる化学受容体遺伝子の進化のメカニズムを知る新しい手がかりを提供したことが大きな成果である。ゲノムデータは今日でもモデル生物以外のほとんどの動植物ではまだ整備が遅れている。本論文の内容は味覚受容体遺伝子の体系的な配列解析データとしてキイロショウジョウバエのものと比較できる初めての大規模な解析結果であり、ゲノム情報学の研究成果として、またオナジショウジョウバエゲノムデータベースへの貢献データとしても高く評価できる。

よって、本論文は博士(情報科学)の学位論文として合格と認める。